砂鼠利什曼原虫（*Leishmania gerbilli*）染色质与动基体碱性蛋白的初步研究

张建文*　李靖炎
（中国科学院昆明动物研究所）

摘　要

利用纯化的砂鼠利什曼原虫细胞核作为起始材料对其染色质碱性蛋白进行分析，发现这类生物中只存在四种核芯组蛋白（H_4, H_2A, H_2B和H_3）。

用凝胶电泳比较全细胞的与细胞核的碱性蛋白时，检出了一种来自细胞质的酸溶性蛋白（L组分）。细胞化学的检测表明它定位于动基体（Kinetoplast）。

关键词：砂鼠利什曼原虫，染色质，动基体，核芯组蛋白，碱性蛋白

Beck（1964）曾使用免疫荧光技术对锥体虫属中九个种进行检查，未发现有组蛋白存在。但这一结论不久就为Steinert（1965）的实验所否定。此后，许多人试图通过生化手段确定锥体虫染色质中组蛋白的种类，可是始终没有得到统一的结论。这可能与取得的实验材料数量非常有限以及分离纯化这类材料的细胞核很困难有关。

到目前为止，关于锥体虫科的核染色质研究虽然已经积累了一些资料，但也仅限于极少数种类，克氏锥虫（*Trypanosoma cruzi*），布氏锥虫（*T. brucli*），翁氏短膜虫（*Crithidia oncopelti*）等，而有关利什曼原虫属核染色质的碱性蛋白的研究，迄今未见报道。我们以中国特有的甘肃大砂鼠利什曼原虫（*Leishmania gerbilli*）的前鞭毛体为材料进行了研究，并对其动基体的碱性蛋白也作了初步研究。

材 料 和 方 法

1.材料培养

砂鼠利什曼原虫（*L. gerbilli*）系王捷等（1964）在甘肃大砂鼠体内分离并培养

---

* 现在中国医学科学院医学生物学研究所。
中国预防医科院寄生虫研究所王捷教授惠赠砂鼠利什曼原虫，特此感谢。
本文1987年7月3日收到，同年9月10日修回。

而得。虫体的培养基本参照吴传芬等（1985）所使用的方法进行。

2.细胞核分离

细胞核分离按张建文等（1987）建立的*L. gerbilli*核分离程序进行。

3.碱性蛋白提取

（1）以分离核为材料的提取：按Rizzo等（1974）的2*M* NaCl法进行，但略有修改。

所分离的细胞核用ST液（0.15*M* NaCl，10m*M* $MgSO_4$，0.5m *M* PMSF，25m *M* Tris-HCl，pH7.5）洗涤两次，悬浮于10倍体积的2*M* NaCl中，在4℃过夜。3,500 rpm×10′离心，收集上清，加入浓盐酸至HCl浓度为0.25*N*。4°C中静置25′后提取液中出现絮状沉淀，3,500rpm×10′离心，弃沉淀。收集上清于透析袋内，对0.25*N* NaCl透析过夜后，将透析袋转入200ml浓蔗糖（2*M*）中浓缩样品至原体积的1/5～1/6。再离心一次弃沉淀。上清经丙酮沉淀后真空干燥，所得物即为*L. gerbilli*核染色质组蛋白。

（2）以全细胞为材料的提取：参照Netrawali法（1970）进行。

收集新鲜虫体材料用ST液洗涤三次至血色褪尽，用分离细胞核时所用的方法破碎细胞，再用ST液洗涤破碎物五次。之后，按核提取程序进行。

（3）全细胞甲醇固定——0.25*N* HCl提取：

经洗涤的材料用甲醇分别固定不同长短的时间：45，90，120，180分钟。离心弃甲醇后分别以5倍体积的0.25*N* HCl提取1小时。提取物用丙酮沉淀，真空干燥。

4.电 泳

通过前述各步骤得到的蛋白样品分别按照Hardison（1978）使用的方法作尿素系统电泳分析。若考马斯亮兰不能清晰地显示蛋白带，则使用Waray（1981）的方法作银染色复染。

5.碱性蛋白的细胞化学检查

（1）材料处理：经培养十二天后收集的虫体用ST液洗涤三次后分别作不同的处理，再涂片作细胞化学反应。

（a）于中性福尔马林（10% Formalin，2%乙酸钠）中直接固定10小时以上。

（b）先在甲醇中固定3小时，再以中性福尔马林固定10小时以上。

（c）在甲醇中固定3小时后，用0.25*N* HCl提取1小时，之后在中性福尔林中固定10小时以上。

（2）碳酸铵银反应（A—S反应）：参照吴传芬等（1984）对Tramezzani法的改良方法进行。

结　果

1.碱性蛋白的电泳分析

从纯化细胞核制取的核组蛋白在电泳中分出四个组分，分别对应于标准组蛋白（小牛胸腺组蛋白）H_4，H_2A，H_2B 和 H_3，没有发现对应于 H_1 的组分（图 1—a）。而通过 Netrawali 法从全细胞制备的碱性蛋白中却分出了五个组分，迁移较快的四种与核提取物相同，剩下一种迁移较慢，在迁移率上类似于组蛋白 H_1，我们称之为 L 组分（图 1—b）。

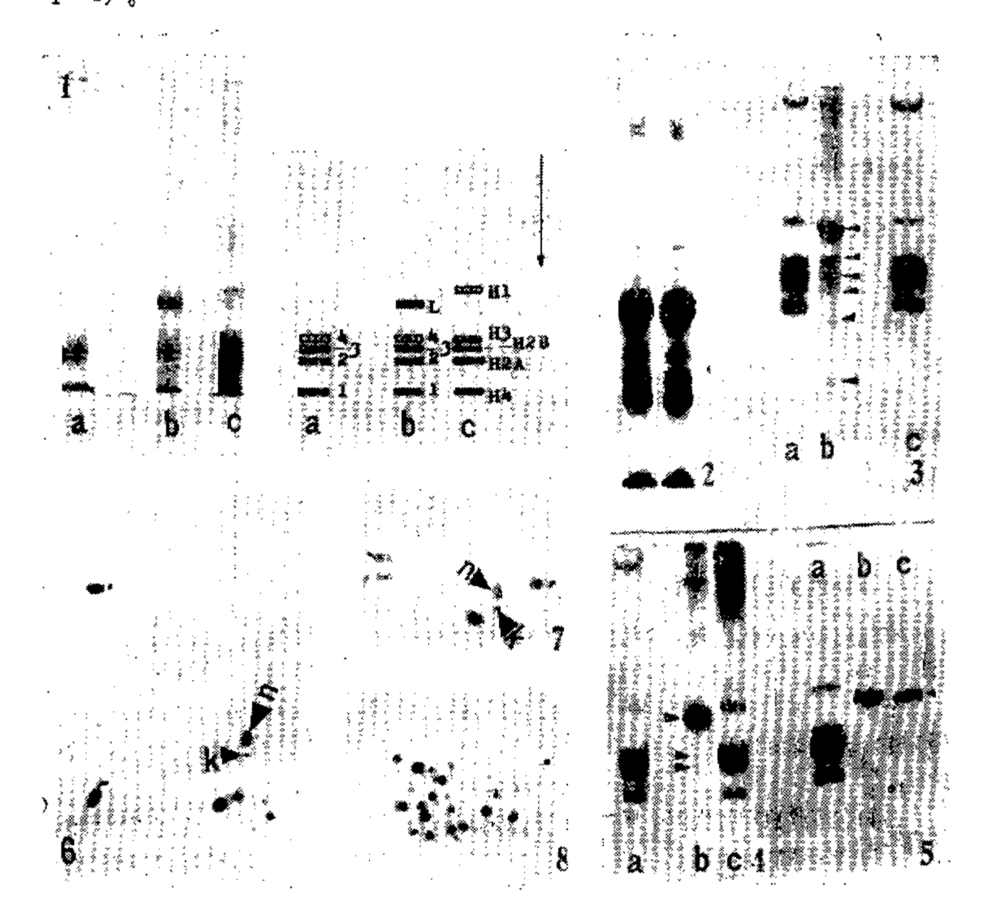


图 1　电泳图谱：a、从纯化利什曼原虫细胞核制备的碱性蛋白；b、从利什曼原虫全细胞中制备的碱性蛋白；c、标准小牛胸腺组蛋白。

图 2　电泳图谱：利什曼原虫全细胞稀酸提取物。

图 3　电泳图谱：a和c为小牛胸腺组蛋白；b为经甲醇固定45分钟后的利什曼原虫稀酸提取物。

图4 电泳图谱：a为兔肝匀浆物经甲醇三小时固定后的酸提取物；c为小牛胸腺标准组蛋白；b为利什曼原虫全细胞经甲醇固定两小时后的酸提取物。

图5 电泳图谱：a为小牛胸腺组蛋白；b和c为利什曼原虫全细胞经三小时甲醇固定后的酸提取物。

图6 利什曼原虫的碳酸铵银反应：不经甲醇固定。

图7 利什曼原虫的碳酸铵银反应：经过甲醇固定

图8 利什曼原虫的碳酸铵银反应：经甲醇固定后作稀酸提取。

用0.25N HCl对虫体全细胞直接抽提，电泳表明提取物中至少含有12种酸溶性组分（图2）。在提取之前先以甲醇固定45分钟，酸提取物中酸溶性组分减少到6种（图3箭头），甲醇固定90分钟后酸提取物中只出现3条电泳带，若用银复染还可显示出两条很弱的带。若固定120分钟后作酸提取，结果出现了3条带，其中两条相当弱（图4箭头）。当把甲醇固定的时间延长至180分钟分上，提取物中只含有一种酸溶性组分，其迁移率类似H_1（图5箭头），正是前述的L组分。很明显，随着甲醇固定时间延长，从虫体全细胞中提取的酸溶性组分的种类和数量减少，但似乎甲醇对L组分并无固定作用。

2.碳酸铵银反应

为了弄清甲醇固定对 *L. gerbilli* 胞核及动质体碱性蛋白的溶酸性影响，对经不同处理的虫体细胞作A—S反应，显示碱性蛋白的有无。

虫体经中性福尔马林固定后作 A—S 反应，结果与吴传芬观察到的一致，胞核与动基体的阳性显色率均为100%（图6箭头）。虫体先以甲醇固定3小时再用福尔马林固定，结果表明甲醇处理对核及动基体的显色并没有影响，阳性率仍为100%（图7箭头）。若甲醇固定后继续作0.25 N HCl 提取，之后进行 A—S 反应，表明胞核的阳性率仍为100%，而动基体的阳性率却降为32%（图8）。

讨 论

1.核染色质组蛋白种类

在纯化的细胞核中我们只检出四种染色质碱性蛋白，与标准蛋白对照它们就是组蛋白H_4，H_2A，H_2B和H_3，没有发现H_1组分。可是以同样的方法从虫体全细胞中却抽出了五个组分，前四种与核提取物中四种相同，而迁移较慢的一种则是核提取物中未发现的L组分。虽然在电泳行为上它与组蛋白H_1相似，但我们并不认为它就是 *L. gerbilli* 的H_1。

已知在短膜虫和锥虫两个属都有四种核芯组蛋白，然而这类生物中是否也存在非核芯组蛋白H_1，迄今尚无一致的看法。1980年 Filho等发现克氏锥虫中除存在四种核芯组蛋白外，还存在非核芯组蛋白H_1组分。可是这个H_1在电泳行为上与高等生物H_1相差甚远，其泳动很快。他认为它与 Caplan（1975）在纤毛虫 *Oxytricha* sp. 中所发现的“高迁H_1”是同一类型的组蛋白。Leaver（1971）在短膜虫中也曾发现有这一组分。但后来这种所谓“高迁H_1”组分被 Pinheiro（1980）的实验否定了。然而Pinheiro也赞同克氏锥虫有H_1的观点，因为在他的实验中发现了一种可以被0.5M NaCl 提取的蛋

白质，分子量约14000，与高等生物的H_1一样可以在电泳后为考马斯亮兰R250染成紫红色而不是紫兰色。但是Rubio（1980）的工作和后来Heccker（1985）的研究都认为锥虫属原生动物的染色质中不存在与组蛋白H_1相当的碱性蛋白。

到目前为止，还没有关于利什曼原虫属组蛋白的报道。从我们的研究结果看，至少在*L. gerbilli*染色质中也缺少组蛋白H_1而只存在四种核芯组蛋白。所以我们在利什曼原虫上得到的结果与Rubio和Hccher在锥虫上得到的结论是一致的。或者可以作出这样的推测：锥虫类原生动物普遍缺少组蛋白H_1，而这正是造成这类生物在整个核分裂周期中染色质始终处于弥散状态而不会凝聚成致密的中期染色体的主要原因。现在一致认为组蛋白H_1在染色质纤维凝聚过程中起着关键作用。Hercker曾用0.5*M* NaCl从大鼠肝染色质中提出组蛋白H_1，然后把它加到克氏锥虫染色质中，结果看到其染色质纤维显著的增粗。这表明锥虫的染色质有发生凝聚的潜力。所以，在研究组蛋白H_1的发生，进化以及染色质凝聚成染色体的机制上，锥体虫类原生动物无疑是很有用的实验材料。

2.L组分在胞质中的初步定位

Rusch与Woodard在五十年代末即已指出，用稀盐酸可以从经甲醇固定的材料中抽去组蛋白。李靖炎（1963）提出的显示细胞核非组蛋白的三个方法之一，就是先用稀酸从甲醇固定的材料中抽去碱性组蛋白。以后这一方法被陈云鹤等（1983）用于前环藻核碱性蛋白的提取，因为这类藻细胞核的分离也十分困难。因而我们在作*L. gerbilli*染色质碱性蛋白提取时也采用了甲醇固定盐酸抽提法。然而我们意外地发现甲醇对*L. gerbilli*核碱性蛋白虽然同样有固定作用（甲醇固定的时间愈长，被抽出的碱性蛋白就愈少），可是甲醇对源于胞质中的L组分似乎就不存在这种固定作用，无论对虫体作多长时间的固定它都可以被0.25*N* HCl提取出来。

基于组蛋白与L组分的上述特点，我们用细胞化学方法A—S反应给L组分作定位，因为该反应被认为是检查碱性蛋白有无的最敏感的反应。我们发现虫体经甲醇固定后再用稀盐酸提取，则动质体A—S反应阳性率从100%降至32%，而细胞核的阳性显色率仍为100%。显然，经甲醇长期固定后*L. gerbilli*核中的碱性蛋白的酸溶性发生了变化，而动质体碱性蛋白却没有这种改变。细胞化学的实验证实了生化提取中发生的现象。根据生化分析的结果，我们只能推测L组分分布在胞质中，而细胞化学的研究则把L组分可能存在的位置初步确定在动基体中。

Rubio在对克氏锥虫*T. cruzi*的研究中曾发现，若提组蛋白时细胞核的纯度较低，提取物中除有四种核芯组蛋白外还有另外两个组分，它们在电泳中的泳动位置在H_1附近；可是当把分离核的纯度提高，提取物中这两个组分也就消失了。他认为它们是源于动质体的污染。现在看来，Rubio所提到的这两个组分很可能就是我们指的L组分。吴传芬等在研究*L. gerbilli*动基体碱性蛋白时曾发现，若先用0.18*N* HCl—80%乙醇对虫体进行选择性提取，之后作A—S反应，则动质体的阳性率从100%降为65%，而细胞核的阳性率仍为100%。这与我们的结果是相符的。

根据内共生起源学说，现代真核细胞中的线粒体起源于远古时代的细胞内共生的真细菌，在现代真核细胞的线粒体中还残留着一些远古时代真细菌祖先的特征。线粒体含有自己的遗传系统，一些学者还相继在不同的材料中提取出与线粒体DNA结合着的碱

性蛋白质—HM蛋。在真细菌的拟核区中也有一种与DNA结合的碱性蛋白—HU蛋白，因而可以对这两者进行比较。锥体虫类原生动物在进化上分类地位较低，而且它的动基体作为线粒体的染色质结构，所含的碱性蛋白量相对较多。所以，对动基体碱性蛋白的研究将有助于我们认识从HU蛋白向HM蛋白的演化过程，进一步充实线粒体的内共生起源学说。

参考文献

王捷等 1964 我国西北地区大砂鼠利什曼原虫的研究。寄生虫学报 1：105—114。

李靖炎 1963 细胞核内非碱性蛋白质显示方法的研究。实验动物学专业学术讨论会论文摘要 158—159

李靖炎 1979 细胞在生命进化历史中的发生 真核细胞的起源。科学出版社。

陈云鹤等 1983 前环藻（*Amphidinium carterae*）染色质碱性蛋白的研究。动物学研究 4：315—320

Beck, J. S. *et al*. 1964 Antigenicity of Trypanosomes nuclei: Evidence that DNA is not coupled to histones in these protozoa. *Nature* 204:194—195.

Brasch, K. 1976 Studies on the role of histone Hl and H5 in chromatin structure. Exp. Cell Res. 101: 396—410.

Caplan, E. B. 1975 A rapidly migating H1 histone associated with gene-sized pieces of DNA in the macro nucleus of *Oxytricha* sp. *Biochem. Biophys. Acta* 407:109—113.

Caron, F. *et al*. 1979 Charaterization of a histone like protein extracted from yeast mitochrondria. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 76:4265—4269.

Englund, P. T. *et al*. 1982 The molecular biology of Trypanosomes. Ann. Rev. Biochem. 51:695—726.

Filho, S. A. *et al*. 1980 On the chromatin structure of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1:45—53.

Hardison, R. *et al*. 1978 Polyarylamide gel electrophoretic fractionation of histones *Met. Cell Biol*. 17:235—251.

Hecker, H. *et al*. 1985 The compaction pattern of chromatin of Trypanosomes. *Biol. Cell* 53:199—208

Kuroiwa, T. *et al*. 1976 A method of isolatiom of mitochondrial nucleoid of Physarum polycephalum and evdence for the presence of basic protein. *Exp. Cell Res*. 97:435—440

Laurent, G. *et al*. 1970 Electron microscopy of kinetoplast DNA from *Trypanosoma mega*. Proc. *Nat. Acap. Sci. USA* 66:419—424.

Leaver, J. L. 1970 Occurence of histones in the Trypanosomatid flagellate *Crithidia oncopelti*. Biochem. J. 125:44p.

Netrawali, M. S. 1970 On the presence of histones in *Euglena gracilis var*. Bacillaris. *Exp. Cell Res*. 63:422—426.

Pinheiro, M. L. 1981 Estructura da chromatina de *Trypanosomea cruzi*. Master's Thesis, Universidade Brazilia, Brazil.

Rizzo, P. J. *et al*. 1974 Isolation and partial characterization of Dinoflagellate chromatin. *Biochem. Biophys. Acta* 349:402—414.

Rubio, J. Y. R. *et al*. 1980 Subunit structure of *Trypanosoma cruzi* chromatin. *Can. J. Biochem*. 58:1247—1251.

Souto-Padron, J. *et al*. 1978 Ultrastructural localization of basic protein in *Trypanosoma cruzi*. *J*.

Histochem. Cytochem. **26**:349—358.

Steinert, M. 1965 L'absence D'histone DNAs, Le Kinetonucleus des Trypanosomes. *Exp. Cell Res.* **39**:69—73.

Waray, W. *et al.* 1981 Silver stainig in polyacylamide gel. *Anal. Biochem.* **118**:197—203.

PRELIMINARY STUDIES ON THE BASIC PROTEINS IN NUCLEAR CHROMATIN AND KINETOPLAST OF *LEISHMANIA GERBILLI*

* Zhang Jianwen Li Jingyan
(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica, China)

Isolated nuclei of *L. gerbilli* were used to investigate the nuclear basic proteins. We found that only four kinds of histones (H4, H2A, H2B and H3) present in *L. gerbilli*; histone H1 was absent.

When basic proteins extracted from whole cells were compared with those extracted from purified nuclei by electrophoresis, an acid-soluable basic protein (L component) was found existing in the kinetoplast.

Key Words: *Leishmania gerbilli*, chromatin, kinetoplast, core histones, basic proteins

(* The present address: Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming, China)